云 南 植 物 研 究 2002，**24**（3）：352～358
Acta Botanica Yunnanica

从 *rbc*L 序列探讨单室茱萸属的系统位置*

李耀利[1]，朱 华[1]，杨俊波[2]
（1 中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部，云南 昆明 650223；
2 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明 650204）

摘要：为了探讨单室茱萸属 *Mastixia* 的系统位置，本文对八蕊单室茱萸（*Mastixia euonymoides*）、云南单室茱萸（*M. pentandra* subsp. *chinensis*）及近缘物种云南紫树（*Nyssa yunnanensis*）和毛八角枫（*Alangium kurzii*）的 cpDNA 中编码 1，5－二磷酸核酮糖羧化酶大亚基的 *rbc*L 基因序列进行了双脱氧测定。通过对这些序列与广义山茱萸科 Cornaceae 和 *Mastixia* 曾被归入的科的类群的 *rbc*L 序列进行 PAUP（Phylogenetic Analysis Using Parsimony）分析，得到 24 棵最简约的分支树图。PAUP 分析表明单室茱萸属与马蹄参属 *Diplopanax*、紫树属 *Nyssa*、喜树属 *Camptotheca* 和珙桐属 *Davidia* 的亲缘关系最近，并由分支图支持可以将 *Mastixia* 提升为山茱萸目 Cornales 中的一个科——单室茱萸科 Mastixiaceae。
关键词：单室茱萸属；*rbc*L 序列；系统学
中图分类号：Q 949，Q 75 **文献标识码：**A **文章编号：**0253－2700(2002)03－0352－07

Systematic Position of the Genus *Mastixia*: Evidence from *rbc*L Gene Sequences

LI Yao-Li[1]，ZHU Hua[1]，YANG Jun-Bo[2]
(1 *Kunming Division of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*，*Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650223，China；
2 *Kunming Institute of Botany*，*Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650204，China)

Abstract: In order to reveal the phylogenetic position of *Mastixia*，the *rbc*L sequences of two species of *Mastixia* (*M. pentandra* ssp. *chinensis* and *M. euonymoides*) and other two possible close affinities *Nyssa yunnanensis* and *Alangium kurzii* were sequenced. PAUP analysis was made based on our sequences and some other *rbc*L sequences of taxa of Cornaceae sensu lato and some families，which *Mastixia* was ever placed in，from Gene Bank database. 24 most parsimonious trees were obtained. It is revealed that the genus *Diplopanax* and the family Nyssaceae (Nyssa，Camptotheca，Davidia) *have the closest affinities to* Mastixia *from the trees. Our results support that the genus* Mastixia *can be given a family state in Cornales.*
Key words: *Mastixia*；*rbc*L sequences；Phylogeny

自 Blume 于 1826 年建立单室茱萸属 *Mastixia* 以来，其系统位置经常变动。Blume 最初把单室茱萸属 *Mastixia* 放入忍冬科 Caprifoliaceae，后来又把它归入紫树科 Nyssaceae。在

* 基金项目：云南省自然科学基金 98C096M，中科院百人计划，中科院 KSCX2－1－06B 课题支持项目
收稿日期：2001－05－28，2001－12－26 接受发表
作者简介：李耀利（1977－）女，在读硕士，主要从事植物分类学和植物地理学的研究。

1844 年 Wight 建立 *Bursinopetalum*（Mastixia 的异名），放入铁青树科 Olacaceae。Miers 据果实形态把 *Mastixia* 归入冬青科 Aquifoliaceae。又因该属植物的花相似于常春藤属 *Hedera*，Thwaites 把它归入五加科 Araliaceae，后来他又把它移入茶茱萸科 Icacinaceae。Baillon 先将 *Bursinopetalum* 并入 *Mastixia*，后又将它放入五加科 Araliaceae。这些隶属关系的变动可参见 Matthew（1976）的文章。*Mastixia* 被归入这么多类群，说明 *Mastixia* 与这些类群或多或少有联系。

20 世纪以来，*Mastixia* 一般作为属或亚科被归入山茱萸科 Cornaceae。如 Matthew（1976）修订了该属植物，确立它为山茱萸科 Cornaceae 的一个属。Cronquist 在 1981 年把 *Mastixia* 跟 *Aralidium*、桃叶珊瑚属 *Aucuba*、梾木属 *Cornus*、*Corokia*、*Curtisia*、*Griselinia*、青荚叶属 *Helwingia*、*Kaliphora*、*Melanophylla* 和鞘柄木属 *Toricellia* 一起归入 Cornaceae，并且 Cornaceae 跟八角枫科 Alangiaceae、蓝果树科 Nyssaceae（*Nyssa*、*Camptotheca* 和 *Davidia*）和 Garryaceae 一起组成山茱萸目 Cornales。Harms、Wangerin 和 Eyde 曾把此属上升为或归入 Cornaceae 单室茱萸亚科 Mastixioideae。（Xiang 等，1993）。但是，也有人如 Bullock（1958）、Takhtajan（汤彦承等，1998）和朱伟华等（1999）主张将此属独立为或放入单室茱萸科 Mastixiaceae。

马蹄参属（*Diplopanax*，仅马蹄参 *D. stachyanthus* Hand.-Mazz.一种）最初被置于 Araliaceae，后来渐被归入 Cornaceae 或 Mastixiaceae。朱伟华等（1998a；1998b；1999）和向其柏等（1988）对 *Diplopanax* 进行了形态解剖学、木材解剖学、植物化学和孢粉学方面的研究，支持 *Diplopanax* 不适合置于 Araliaceae 的观点，并基于 5 点：（1）单室茱萸类的胚珠为上转胚珠，山茱萸类（广义山茱萸属）为下转胚珠；（2）单室茱萸类的基本花序为聚伞花序，山茱萸类是伞形花序或头状花序；（3）单室茱萸类的子房 1 室，山茱萸类子房 2 室；（4）单室茱萸属和马蹄参属的果实都为核果，且内果皮具一向内隆起的脊，胚马蹄形，与山茱萸类不同；（5）从古植物学资料看，单室茱萸类的内果皮向内隆起形成一个不完全的种隔这一特征在晚白垩纪的化石中就已出现了，并且已形成一个比较独立的演化枝）。提出将单室茱萸类群（包括 *Mastixia* 和 *Diplopanax*）作为 Cornales 中的一个科 – Mastixiaceae。

以上对 *Mastixia* 的研究是基于形态学和古植物学等非分子的分类方法。Xiang 等（1998；1996；1993）根据基因序列（*rbc*L，*mat*K，*rbc*L-*mat*K），研究了 *Cornus* 属下物种之间及 Cornaceae 各属之间的亲缘关系，由他们的研究看出 *Aucuba*，*Corokia*，*Griselinia*，*Helwingia*，*Kaliphora*，*Melanophylla* 和 *Toricellia* 等与 *Mastixia* 亲缘关系比较远，而其它属如 *Cornus*，*Alangium*，*Curtisia*，*Nyssa*，*Camptotheca*，*Diplopanax* 和 *Davidia* 与 *Mastixia* 关系较近。

本研究是在 Xiang 等（1993；1998）研究的基础上，增加了 *Mastixia* 曾被归入的科的类群，共选类群 27 个并对它们的 *rbc*L 基因序列进行 PAUP 分析，进一步探讨 *Mastixia* 属的系统位置和该属与其近缘属的关系，为深入研究 *Mastixia* 植物的系统进化和地理分布格局的形成提供基础。

1 材料和方法

1.1 研究类群

依据前人的研究资料（Xiang 等，1993；1998；Matthew，1976），选择的研究类群共有 27 个。这 27 个类群包括广义山茱萸科 Cornaceae 的 15 个属，还包括 *Mastixia* 曾被放入的科的类群如 Aquifoliaceae 的云南冬青 *Ilex yunnanensis*，Araliaceae 的洋常春藤 *Hedera helix* 和竹节参 *Panax japonicus*，Caprifoliaceae 的 *Lonicera orientalis*，Olacaceae 的秘鲁青皮木 *Schoepfia schreberi* 和 Icacinaceae 的 *Pyrenacantha malvifolia*。其中，八蕊单室茱萸（*Mastixia euonymoides*）、云南单室茱萸（*M. pentandra* subsp. *chinensis*）及近缘物种云南紫树（*Nyssa yunnanensis*）和毛八角枫（*Alangium kurzii*）的 *rbc*L 基因序列由作者测得，它们的叶片样品采自云南勐海县勐宋和勐腊县勐仑，凭证标本存于 HITBC。其它物种的 *rbc*L 序列来自 GenBank。依 Takhtajan 1997 年的系统（汤彦承等，1998）和 Chase 等（1993）的工作，选 *Cunonia atrorubens*、*Brunellia colombiana* 和 *Saxifraga integrifolia* 为外类群。本研究所涉及的 30 个类群见表 1。

表 1 PAUP 分析的物种及其 ***rbc*L** 序列的 **Accession numbers***

Table 1 The species and accession numbers of *rbc*L sequences for PAUP analysis in this paper

目 Orders	科 Families	物种 Species	Accession numbers
Cornales	Alangiaceae	*Alangium kurzii*	AF384107
	Nyssaceae	*Nyssa yunnanensis*	AF384106
		Camptotheca acuminata	L11211
		Davidia involucrata	L11223
	Cornaceae	*Mastixia euonymoides*	AF384108
		M. pentandra subsp. *chinensis*	AF384109
		Aralidium pinnatifidum	AF299087
		Aucuba japonica	L11210
		Cornus chinensis	L11214
		Cornus walteri	L11220
		Corokia cotoneaster	L11221
		Curtisia dentata	L11222
		Griselinia littoralis	AF307916
		Helwingia japonica	L11226
		Kaliphora madagascariensis	AJ402963
		Melanophylla pachypoda	AF299088
		Toricellia tiliifolia	AF299089
		Diplopanax stachyanthus	L11224
	Garryaceae	*Garrya elliptica*	L01919
Rosales	Hydrangeaceae	*Hydrangea macrophylla*	L11187
Violales	Loasaceae	*Loasa loxensis*	U17876
Apiales	Araliaceae	*Hedera helix*	LO1924
		Panax japonicus	D44580
Celastrales	Aquifoliaceae	*Ilex yunnanensis*	X98732
	Icacinaceae	*Pyrenacantha malvifolia*	AJ402995
Dipsacales	Caprifoliaceae	*Lonicera orientalis*	X87389
Santalales	Olacaceae	*Schoepfia schreberi*	L11205
Rosales	Brunelliaceae	*Brunellia colombiana*	AF291937
	Cunoniaceae	*Cunonia atrorubens*	AF291918
	Saxifragaceae	*Saxifraga integrifolia*	L01953

* Note：The families and orders are based on the classification system of Cronquist（1981）mainly.

1.2 方法

本研究中的分子实验部分和数据分析部分是在中国科学院昆明植物研究所分子生物地理学实验室进行的。

1.2.1 总 DNA 的提取 从硅胶干燥过的叶片提取总 DNA，提取方法为改良的 CTAB 法（Doyle 等，1987）。

1.2.2 PCR 扩增反应 以 *rbc*L1F（5′ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT 3′）和 *rbc*L 1496R（5′GAT TGG GCC GAG TTT AAT TAC 3′）为扩增引物（俸宇星等，1998），在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上扩增 *rbc*L 片段。

PCR 反应体积约 20 μL，内含 14 μL ddH_2O，10 × PCR 缓冲液 2 μL，引物各约 0.5 μL，dNTP 2 μL，聚合酶（Taq E）0.5 μL 和总 DNA 0.1 μL。PCR 程序为 94℃预变性 5 min，然后 94℃ 1 min，52℃ 1 min，72℃ 1 min 35 个循环，最后 72℃延伸 10 min，4℃冰箱贮存。扩增产物用华舜公司的 PCR 纯化试剂盒（Watson 's Purification Kit）进行纯化以除去未参加反应的引物及核苷酸后直接用于测序。

1.2.3　DNA 序列的测定　测序反应在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上进行，反应体积为 5 μL，内含引物（分别为 *rbc*L1F，*rbc*L991R（5′CGG TAC CAG CGT GAA TAT GAT 3′，*rbc*L1496R），0.5 μL（俸宇星等，1998），模板 1.0 μL，dd H_2o 1.5 μL，2 μlLmix（PE 公司的 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction DNA Sequencing Kit）。测序反应程序为：94℃ 10 s，50℃ 5 s，60℃ 4 min，30 个循环，最后置于 4℃保存。测序产物在 PE 公司的 ABI 310 自动测序仪上进行电泳检测。

1.2.4　序列分析　用 Clustal X（Toby Gibson *et al*，EMBL，Heidelgerg，Germany）软件对所测序列进行排序后，用 PAUP4.0 b8（Swofford，2001）软件构建分支树图。PAUP 分析采用启发式搜索（Heuristic search）的方法。启发式搜索的主要选项为：SIMPLE 数据加入顺序，MULTREES ON，TBR 分支交换算法，序列空位 Gap 当作缺失 missing。为了评估各个分支的可信性，还进行了靴带分析（Bootstrap analysis）。靴带分析的主要选项为：重复次数 1 000，Gap = missing，SIMPLE 数据加入顺序，TBR 等。

2　结果

DNA 测序得到 4 个物种的 *rbc*L 序列，长 1 338 – 1 396 bp。这几个序列已存于 GenBank 数据库中（accession numbers 见表 1）。排序后的 *rbc*L 序列长 1 489 bp，Gap 作缺失 missing 处理时，变异位点 174 bp，信息位点 205 bp。

以 *Cunonia atrorubens*、*Brunellia colombiana* 和 *Saxifraga integrifolia* 为外类群，Gap 作缺失（missing）处理，用启发式搜索法（Heuristic search）找到 24 棵最简约系统树。图 1 为其中之一，此分支树图步长为 865 步，一致性指数 CI 为 0.5283，保持性指数 RI 为 0.4756。

图 2 为 24 棵最简约树的严格一致树，靴带分析值（Bootstrap values）位于分支的上方。内类群中除 *Schoepfia*，*Pyrenacantha* 和 *Kaliphora* 3 个属基出外，其它类群分成两大分支。第一大分支又可分为 4 个小支，*Curtisia* 支是其它 3 个小支 *Mastixia-Nyssaceae-Diplopanax* 支、*Cornus-Alangium* 支和 *Hydrangea-Loasa* 支的基出支。这与 Xiang 等（1993；1998）的结果相似。*Mastixia-Nyssaceae-Diplopanax* 支是 *Mastixia*，*Diplopanax*，*Nyssa*，*Davidia* 和 *Camptotheca* 组成的单系支，其中两个 *Mastixia* 聚在一起（靴带值为 97%），是其它 4 属 *Diplopanax*，*Nyssa*，*Davidia* 和 *Camptotheca* 组成的多歧分支（靴带值为 73%）的姐妹群（靴带值为 54%）。第 2 大分支由 *Mastixia* 曾被归入的科的类群和除第一分支外的广义山茱萸科 Cornaceae 的其它类群组成。从 *rbc*L 序列来看，曾被放入 Cornaceae 的 9 个属（*Aralidium*，*Aucuba*，*Corokia*，*Garrya*，*Griselinia*，*Helwingia*，*Melanophylla*，*Toricellia* 和 *Kaliphora*）确实离 *Cornus* 等关系较远（Xiang 等，1993；1998）。

3　讨论

Mastixia 作为属的等级及其系统位置争议较多。正如前文所述，*Mastixia* 曾放入 Caprifoliaceae，Nyssaceae，Olacaceae，Aquifoliaceae，Araliaceae 和 Icacinaceae 等。但是随着研究的深入，越来越多的学者发现它与 *Nyssa*，*Camptotheca*，*Diplopanax*，*Cornus* 和 *Davidia* 等关系较近。形态解剖学上，*Mastixia* 与 *Diplopanax* 子房 1 室 1 胚珠，胚弯曲，果实形态形成和

开裂方式相同等（朱伟华等，1999；Eyde 等，1990）；植物化学上 *Mastixia* 与 *Camptotheca*，*Diplopanax*，*Nyssa*，*Davidia* 和 *Cornus* 均属于富含亚油酸系列的植物（朱伟华等，1998b）；从木材解剖学（朱伟华等，1998a）上看，*Mastixia* 和 *Camptotheca*，*Diplopanax*，*Nyssa*，*Davidia* 和 *Cornus* 也相近。本文的 *rbc*L 序列分析得到的严格一致树上 *Mastixia* 与 *Camptotheca*，*Diplopanax*，*Nyssa* 和 *Davidia* 组成一个单系支，这说明 *Mastixia* 与 *Camptotheca*，*Diplopanax*，*Nyssa* 和 *Davidia* 有更为密切的关系。这与 Xiang 等（1998）的研究结果相似。分支图中，*Mastixia* 分支为 *Camptotheca*，*Diplopanax*，*Nyssa* 和 *Davidia* 组成分支的姐妹群。所以，作者认为可以将 *Mastixia* 提升为单室茱萸科 Mastixiaceae，跟 Nyssaceae 一起置于 Cornales。

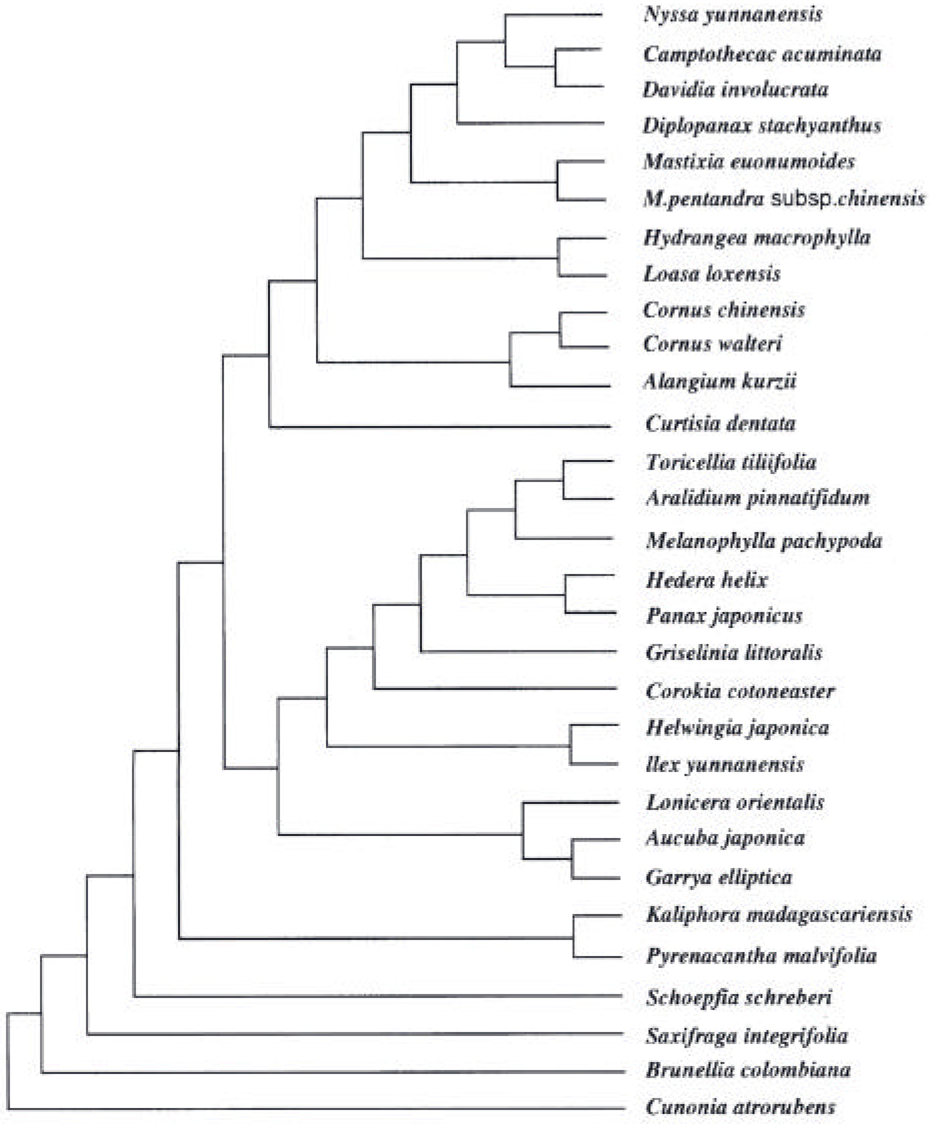

图 1　PAUP 分析 *rbc*L 序列所得的 24 棵最简约分支树图（分支图步长 = 865 步，CI = 0.5283，RI = 0.4756）之一。*Cunonia atrorubens*、*Brunellia colombiana* 和 *Saxifraga integrifolia* 为外类群。

Fig. 1　One of the 24 most parsimonious trees resulting from PAUP analysis of *rbc*L sequences of *Mastixia* and its relatives, using *Cunonia atrorubens*、*Brunellia colombiana* and *Saxifraga integrifolia* as outgroups. The tree has 865 steps with CI = 0.5283, RI = 0.4756.

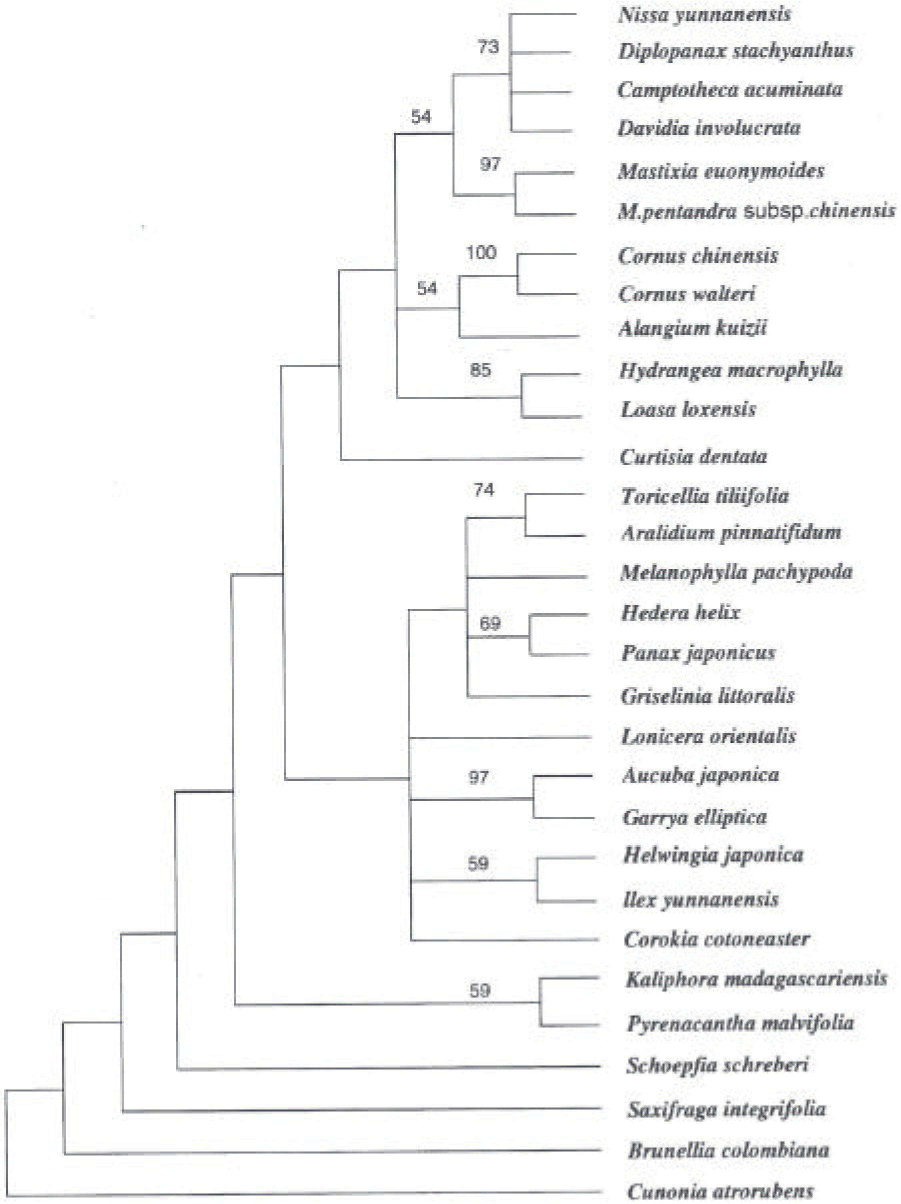

图 2　24 棵最简约树的严格一致树。靴带分析值位于分支的上方

Fig. 2　The strict consensus tree of 24 most parsimonious trees. Bootstrap values (%) are indicated above branches.

Diplopanax 最初被放入 Araliaceae。但越来越多的证据支持将它归入广义 Cornaceae，跟 *Mastixia* 关系最近（武素功，1997；曾沧江，1983；Eyde 等，1990）。在本研究所得的分支图中，*Diplopanax* 并没有与 Araliaceae 的 *Hedera* 和 *Panax* 聚在一起，而是与 *Nyssa*，*Camptotheca* 和 *Davidia* 聚合在一起组成多歧支（靴带值为 73%）。可见本文的序列分析和 Xiang 等（1998）的序列分析也都支持将它放入广义 Cornaceae。但是从分子生物学证据看，*Diplopanax* 并不与 *Mastixia* 的关系最近。所以，本文中所提的 Mastixiaceae 不包括 Diplopanax。

本研究结果表明 *Mastixia* 与 *Camptotheca*，*Diplopanax*，*Nyssa* 和 *Davidia* 有较为密切的关系。*Mastixia* 可以提升为山茱萸目 Cornales 单室茱萸科 Mastixiaceae 的等级。

致谢 昆明植物所分子生物地理学实验室的李德铢研究员，刘爱忠、孟少武博士，王峰，陈永燕，高连明，张志勇，尹廷双，田欣和郭振华等老师和同事给予了很大帮助，西双版纳热带植物园王洪老师和彭国婉同事帮助采集样品。

〔参 考 文 献〕

武素功，1997. **活化石植物—马蹄参** [J]. **植物杂志**，**97**（1）：23

Bullock AA，1958. Indicis Nominum Familiarum Angiospermarum Prodromus [J]. *Taxon*，**7**：161

Chase MW，Soltis DE，Olmstead RG，*et al*，1993. Phylogenetics of seed plants：An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbc*L [J]. *Ann Missouri Bot Gard*，**80**：528—580

Cronquist A，1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants [M]. New York：Columbia Univ，Press，1—1028

Doyle JJ，Doyle JL，1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissure [J]. *Phytochem Bull*，**19**：11—15

Eyde RH，Xiang QY，1990. Fossil Mastixioid（Cornaceae）alive in eastern Asia [J]. *Amer J Bot*，**77**（5）：689—693

Feng YX（**俸宇星**），Wang XQ（**汪小全**），Pan KY（**潘开玉**），*et al*，1998. A revaluation of the systematic positions of the Cercidiphyllaceae and Daphniphyllaceae based on *rbc*L gene sequence analysis，with reference to the relationship in the "lower" Hamamelidae [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*（**植物分类学报**），**36**（5）：411—422

Matthew KM，1976. A revision of the genus *Mastixia*（Cornaceae）[J]. *Blumea*，**23**：51—93

Shang CB（**向其柏**），Callen D，1988. Pollen morphology of the family Araliaceae in China [J]. *Bulletin of Botanical Research*（**植物研究**），**8**（1）：13—48

Tang YC（**汤彦承**），Lu AM（**路安民**），1998. Notes from A. Takhtajan's "DIVERSITY AND CLASSIFICATION OF FLOWERING PLANTS" [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*（**植物分类学报**），**36**（2）：178—192

Tseng CJ（**曾沧江**），1983. The systematic position of *Diplopanax* Hand.-Mazz. [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*（**植物分类学报**），**21**（2）：151—152

Xiang QY，Brunsffld SJ，Soltis DE，*et al*，1996. Phylogenetic relationships in *Cornus* based on chloroplast DNA restriction sites：implications for biogeography and character evolution [J]. *Syst Bot*，**21**：515—534

Xiang QY，Soltis DE，Morgan DR，*et al*，1993. Phylogenetic relationships of *Cornus* L. sensu lato and putative relatives inferred from *rbc*L sequence data [J]. *Ann Missouri Bot Gard*，**80**：723—734

Xiang QY，Soltis DE，Soltis PS，1998. Phylogenetic Relationships of Cornaceae and close relatives inferred from *mat*K and *rbc*L sequences [J]. *Amer J Bot*，**85**（2）：285—297

Zhu WH（**朱伟华**），Xiang QB（**向其柏**），1999. Morphological characters of the genus *Diplopanax* Hand.-Mazz. and it's systematic implication [J]. *Bulletin of Botanical Research*（**植物研究**），**19**（3）：286—291

Zhu WH（**朱伟华**），Xiang QB（**向其柏**），Gan XH（**甘习华**），*et al*，1998a. Wood anatomy of *Diplopanax stachyanthus* Hand.-Mazz. and its systematic implication [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*（**四川农业大学学报**），（1）：106—109

Zhu WH（**朱伟华**），Xiang QB（**向其柏**），Ou HY（**鸥惠英**），1998b. Seed oil fatty acids in the *Diplopanax* Hand.-Mazz. and its systematic significance [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*（**植物资源与环境**），**7**（1）：27—30